

REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES.

Modification épigénétiques : viennent s'ajouter à la séquence nucléotidique. La séquence nucléotidique est transmise intacte de la cellule mère à la cellule fille. Ce qui change ce sont les interactions covalentes, comme la méthylation des cytosines, mais **en aucun cas la séquence nucléotidique.**

I) Méthylation des histones.

Les histones contiennent des résidus basiques (Arg, et Lys en particulier) qui peuvent subir des modifications *post-traductionnelles*. Acétylations, méthylations, phosphorylations.

Ces modifications ont un rôle important : effet en aval sur la régulation de l'expression des gènes. C'est-à-dire que c'est la ***combinaison de plusieurs modifications*** qui va avoir un rôle.

Modifications concertées selon un ordre précis : « **cross-talk** » = langage du code des histones. Action positive ou négative.

La lysine *ne peut être méthylée et acétylée à la fois*. En principe la phosphorylation de la sérine 10 interdit la méthylation de la lysine 9. Mais l'acétylation de la lysine 9 favorise l'acétylation de la lysine 14.

Bref on a compris, les deux marques ne peuvent coexister. Et les AA cross-talkent.

On arrive à tirer des principes généraux :

HISTONE H3

- Méthylation des lysines 9 et 27 → répression. Ça ne signifie pas que toute méthylation = répression
- Triméthylation de la lysine 4 → Activation (reconnue par TFIID)
- Méthylation Arg 17 = Activation.
- Acétylation Lys 9, 14 → Activation
- Phosphorylation sérine 10 et Sérine 28 → condensation métaphase.

Les charges négatives amenées par groupement phosphate → relâchement de l'ADN. Facilitent la transcription.

Les groupements phosphates peuvent constituer un épitope reconnu par les facteurs transcriptionnels.

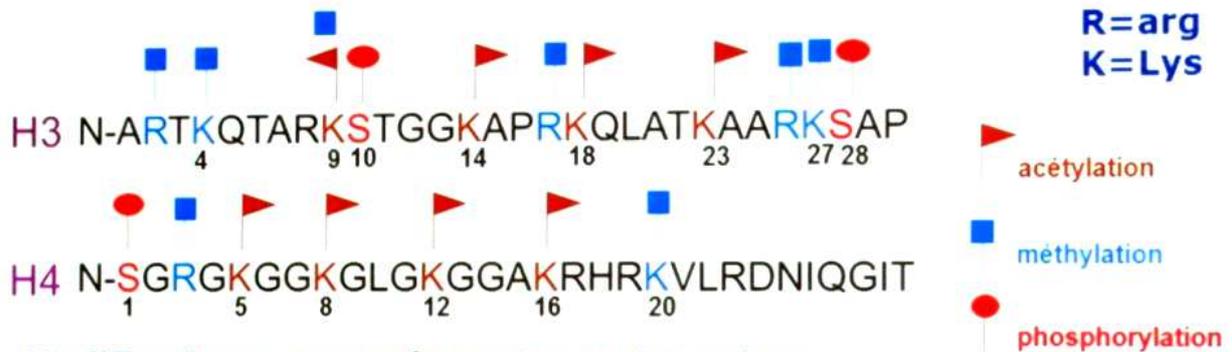
HISTONE H4 :

Méthylation Lysine 20 → répression

Acétylation Lysine 16 → activation.

Perte de la méthylation Lys 20 ou de l'acétylation Lys 16 de l'histone H4 : marque universelle dans des cancers.

Extrémités N-terminales des histones H3, H4



Modifications concertées selon ordre précis:

« cross-talk » = langage ou code des histones

Histone H3

Méthylation Lys 9, 27 → répression

Triméthyl. Lys 4 → activation (TFIID)

Méthylation Arg 17 = activation

Acétylation Lys 9, 14 → activation

Phosphor S 10 et S 28 → condensation métaphase

Histone H4

Méthylation Lys 20 → répression

Acétylation Lys 16 → activation

II) Déamination des cytosines et des 5 méthylcytosines.

La **déamination** de la cytosine en Uracile peut être contrecarrée par une DNA **glycosylase** qui « refait » la cytosine.

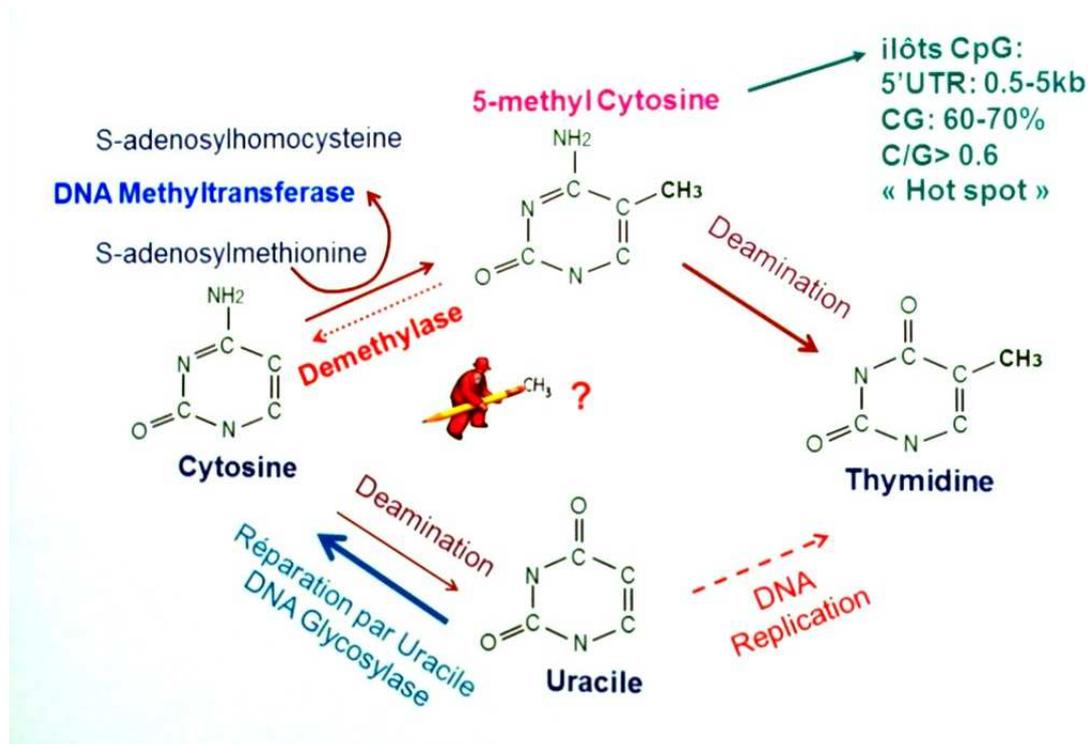
Des 5 méthylcytosines peuvent échapper au système de surveillance et donner une thymidine par déamination et c'est irréversible parce que la **déméthylase** n'existe pas. (en rouge sur le schéma)

Concernant les histones, les modifications covalentes sont réversibles. Mais on n'a pas mis en évidence d'enzyme capable de démétayer l'ADN. Certaines peuvent remplacer le groupement CH₃ mais pas d'enzyme pour le retirer.

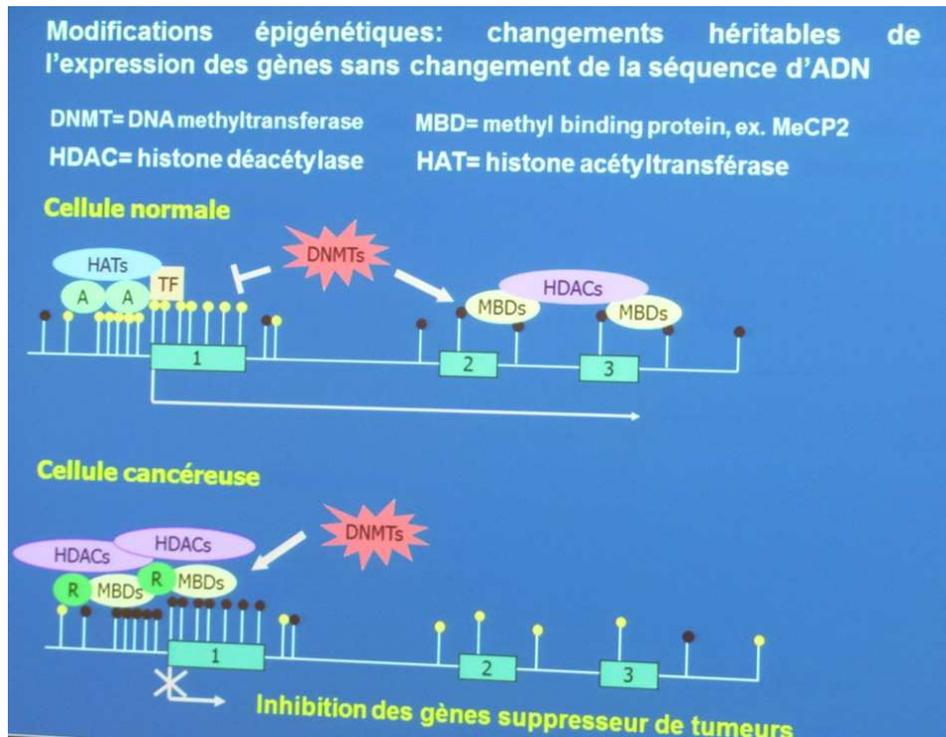
Les 5 méthyl cytosine doivent se trouver dans les îlots CpG dans la partie 5'UTR :

- 0,5 5Kb
- C/G : 60/70%
- Ratio C/G > 0,6
- appelés « hot spot »

La 5 méthyl cytosine est une modification épigénétique.



III) Modifications épigénétiques : changements héréditaires de l'expression des gènes sans changement de la séquence d'ADN.



Différences entre une cellule normale et des cellules cancéreuses.

Les modifications épigénétiques entraînent une modification de l'expression des gènes, transmises de la cellule mère à la fille (héréditaires) mais la séquence nucléotidique ne change pas.

Dans la cellule normale :

Les petites aiguilles jaunes et noires représentent les îlots CpG. Il existe dans le corps du gène quelques îlots CPG. Ils ne sont pas méthylés. Ceux représentés en noir sont méthylés par des ADN méthyltransférases. Donc on voit que ceux à l'extrémité 5' NE SONT PAS METHYLÉS.

Ces îlots sont le point d'ancrage de protéines régulatrices et des facteurs transcriptionnels, et des complexes protéiques activateurs.

Le promoteur n'est pas méthylé → Les facteurs transcriptionnels viennent se fixer et le gène est transcrit.

Par contre, dans le corps du gène, là où les îlots CPG sont méthylés, des protéines reconnaissent le groupement CH

(methyl binding protein) elles ont un chromo domaine qui reconnaît CH. Elles viennent avec un cortège de protéine dont certaines ont une activité histone déacétylase.

Dans la cellule cancéreuse.

Les îlots CPG : c'est l'inverse

Dans la région du recruteur : recrutement des methyl binding protein, et d'autres dont l'activité est histone déacétylase. → Inhibition des gènes suppresseurs de tumeur → cancer

IV) INTERFERENCE DE L'ARN et Pétunias.

Les pétunias expriment une chalcone synthase responsable de la couleur de ces fleurs du rose au violet. Le but des chercheurs était d'obtenir des fleurs qui ont une coloration violette la plus intense possible. On injecte artificiellement la chalcone synthase → surexprimée → fleurs Deep Purple.

Ils ont obtenu soit des fleurs avec plusieurs nuances soit des fleurs carrément blanches. Ils ont appelé ça la **co-suppression**.

Ce phénomène est dû au fait qu'il existe dans les cellules un ARN double brin. L'ADN est constitué d'une double hélice. Mais on a vu que les ARN sont simple brin. Mais les ARN aussi peuvent parfois être double brin. Les ARN adoptent une structure secondaire. (exemple épingle à cheveux) Cette structure en épingle à cheveux peut être considérée comme de l'ARN db.

Les ARN peuvent apparaître dans la cellule sous forme hybridée, et quand ils sont sous forme DB il n'y a plus de traduction.

Si on injecte chez les levures de l'ARN db, ça entraîne l'extinction du gène cible. (= Knock Down) on dit qu'on invalide le gène cible. → **interférence par l'ARN** ou RNAi

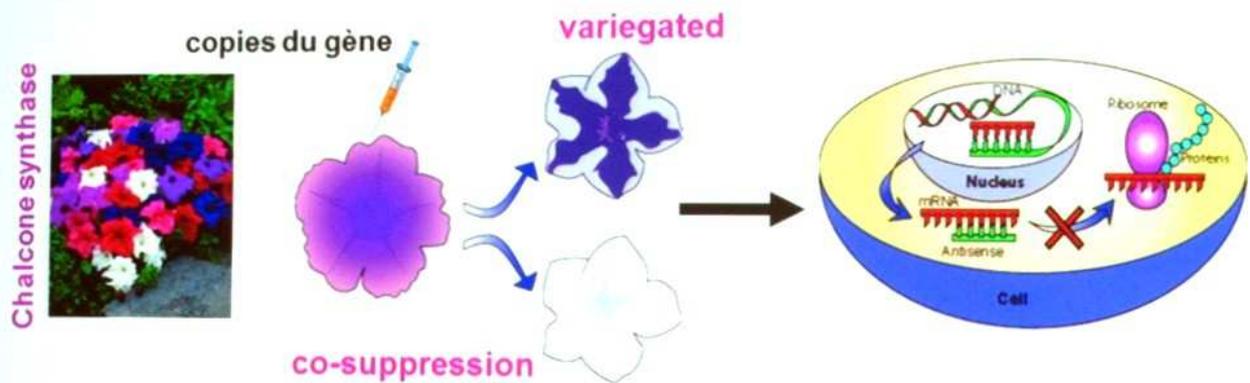
Chez les mammifères, on s'est rendu compte qu'il était très difficile d'utiliser ces ARN db car ils sont cytotoxiques, et provoquent une réaction de défense, notamment l'augmentation de la production d'interférons et de la kinase PKR.

Si cet ADN double brin avait une taille plus petite, la réaction toxique est diminuée. Ces ARN courts c'est des SiRNE (Short interfering RNA)

MicroRNA ou MiRNA → ce sont d'autres ARN non codants, mais qui ont un rôle de régulation sur la traduction ou la transcription.

Il se pourrait qu'ils constituent une protection contre une invasion de gènes exogènes. Ils jouent un rôle très important au cours du développement.

Interférence de l'ARN et Pétunias



Plantes + Levures (*par-1* → développement)

Injection ou adminis. voie digestive **ARN double brin (dsRNA)** → extinction du gène cible = knock-down → **interférence par l'ARN** ou RNAi

Mammifères

dsRNA → cytotoxique → réponse interféron

siRNA (short interfering RNA) = dsRNA courts → toxicité moindre

microRNA ou miRNA = autre catégorie de petits ARN régulateurs non codants

Fonction

Protéger contre l'invasion de DNA exogènes

Rôle grandissant: apoptose- différenciation- **développement**- infec virales

BIOGENESE DES MiRNA

Objectif de l'année : production des miRNA et action sur leur gène cible.

Deux types de gènes :

- soit dans un intron : 25% (sont exprimés au cours de l'épissage)
- soit standard, avec promoteur et transcrits par l'ARN Pol II.
- 250 chez l'homme
- Nomenclature : miR + n° d'ordre de la découverte.

Dans un premier temps, ces gènes sont transcrits sous la forme d'un précurseur = priRNA.

Longueur entre 90 et 200 nucléotides.

Drosha (enzyme) découpe le priRNA en plusieurs pré-MiRNA dont la longueur est entre 65 et 80nt)

De l'exportine emmène ces pré-MiRNA dans le cytoplasme.

DICER donne naissance à MiRNA proprement dit (encore sous forme DB)

A l'extrémité 3' il y a un ou deux nt qui ne s'apparient pas. C'est donc un ARN db avec un brin sens et un brin anti-sens. Il est pris en charge par enzyme RISC.

Ce complexe RISC va ne garder que le brin anti-sens (le plus stable) Le brin sens va être dégradé dans le cytoplasme.

Le brin anti-sens va aller reconnaître un transcrit cible. Ce sont les premiers nucléotides entre 2 et 8 qui sont critiques pour la reconnaissance de l'ADN cible.

Soit la complémentarité est parfaite (100%) → fixation sur la région codante → clivage (dégradation).

Soit la complémentarité est incomplète : l'ARN anti-sens se fixe sur la région 3' de l'ARN est provoque l'inhibition de la traduction.

Le transcrit cible dérive d'une séquence génomique différente de celle qui a donné naissance à l'ARN anti-sens.

Biogenèse des miRNA

miRNA primaire= pri-RNA (90-200 nt)

caractéristiques

-codés par le génome

-abondants

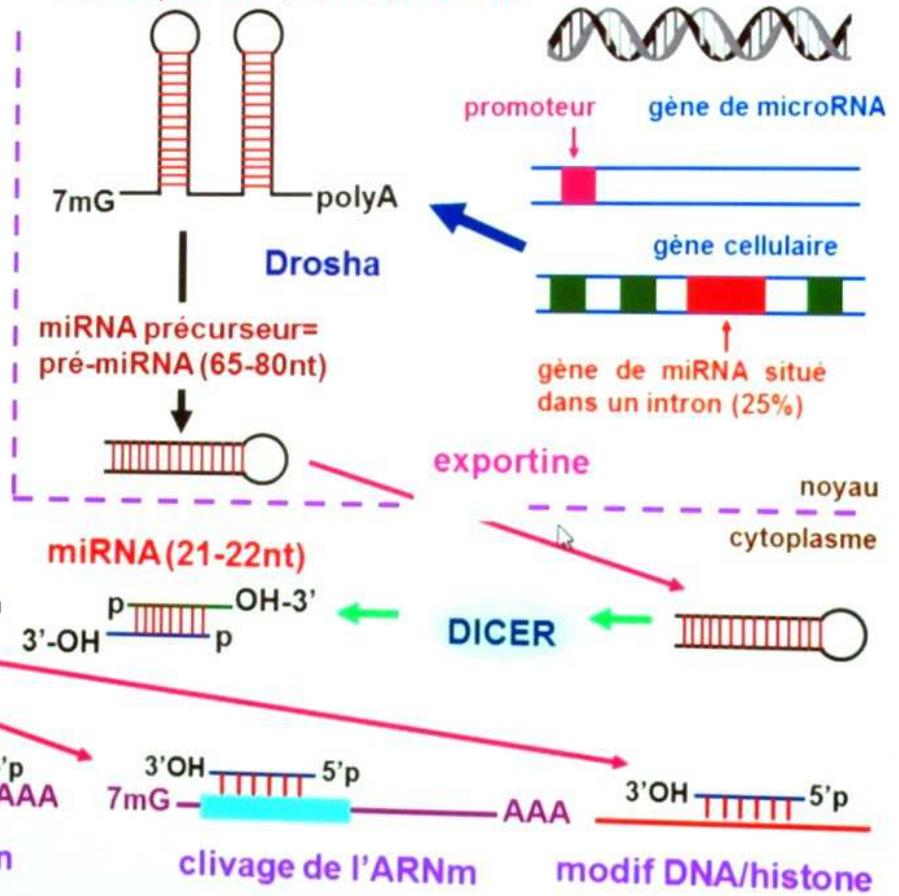
-ARN pol II

-250 chez l'homme

Nomenclat.= miR + n°

-nucléotides 2-8 critiques pour reconnaître ARNm

-degré de complémentarité guide le processus d'inactivation



RNA induced silencing complex

RISC

3'-OH TTTTTT P

7mG - 3'OH TTTTTT 5'p AAA

inhibition de la traduction

miRNA (21-22nt)

3'-OH p OH-3' p

clivage de l'ARNm

modif DNA/histone

exportine

noyau

cytoplasme

DICER

miRNA précurseur= pré-miRNA (65-80nt)

Drosha

7mG polyA

promoteur gène de microRNA

gène cellulaire

gène de miRNA situé dans un intron (25%)

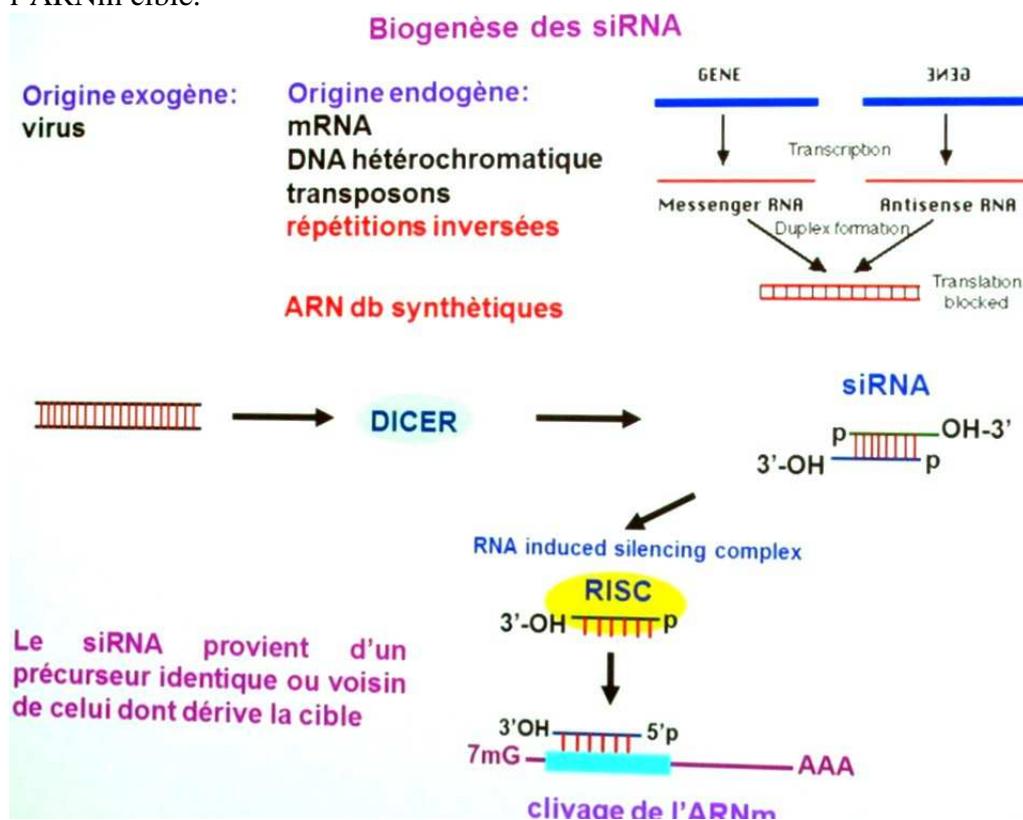
BIOGENESE DES SiRNA.

Origine exogène : virus

Origine endogène : mRNA, DNA hétérochromatique, transposons, répétitions inversées
ARNdb synthétisés en labo puis injectés dans la cellule.

Ils ont les mêmes caractéristiques que les MiRNA → prise en charge par DICER → génère double brin → complexe RISC conserve uniquement le brin antisens, mais dans la plupart des cas, la complémentarité de cet arn antisens est de 100%. L'ARN antisens va venir spécifiquement reconnaître le transcrit ce qui va conduire à la dégradation de l'ARNm.

Le point qui différencie Mi et SiRNA c'est le fait que la complémentarité soit toujours parfaite dont les SiRNA doit venir d'une précurseur identique à celui qui a donné naissance à l'ARNm cible.



RNA editing (= correction français)

Exemple de la protéine ApoB 100 (lipoprotéines de transport, qu'on retrouve dans les LDL transportant le cholestérol).

Contient 4536AA

Dans le foie, l'ARNm qui va être traduit en la protéine contient un codon CAA.

Dans les intestins, CAA subit une déamination par (APOBEC 1 qui est une cytidine déaminase dont la cytidine devient de l'uracile) donc CAA devient UAA et c'est un codon STOP.

Donc il ne reste que APOB48

Important :

Ce phénomène se situe dans deux tissus différents. (Foie : CAA)

Intestins : édition : UAA → APOB → fabrique d'autres protéines : les chilomicrons. (donc changement de fonction)

Le changement est donc visible dans les ARN et non dans le gène. Car le gène à la même séquence. Si on fait un western blot avec un anticorps qui reconnaît N-TER on pourra identifier les deux protéines. (l'une fait 4536 AA, l'autre 2152 AA)

Si on fait un southern blot → on ne pourra rien observer.

Il y a un moyen d'explorer les ARN. On ne peut pas les séquencer mais on peut obtenir un ARN complémentaire (faire une reverse transcription) on utilise une sonde au niveau dT et on utilise la transcriptase inverse qui synthétise de l'ADN complémentaire qui est une copie fidèle du transcrit (version du gène sans les introns) ensuite on utilise la RNA

